Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums
Charlottenburg der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Blümcke)

Untersuchungen zur Frage der Ablagerungen des Fluorkohlenwasserstoffes Fluosol^{R}–DA 20% im Kaninchenorganismus nach parenteraler Anwendung unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen nach operativer Entfernung der Milz

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Marianne Panisch
aus Bad Friedrichshall

1985

Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charlottenburg der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Blümcke)

Untersuchungen zur Frage der Ablagerungen des Fluorkohlenwasserstoffes Fluosol^{R}-DA 20% im Kaninchenorganismus nach parenteraler Anwendung unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen nach operativer Entfernung der Milz

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Marianne Panisch
aus Bad Friedrichshall

Referent: Prof. Dr. med. S. Blümcke

Korreferent: Prof. Dr. med. C.-J. Lüders

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22.2.1985

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Fluorocarbone in der Medizin
1.2 Eigenschaften und Pharmakokinetik der Fluorocarbone
1.3 Probleme der Emulsion
1.4 Ausscheidungsmechanismus
1.5 Probleme der Ablagerung
1.6 Überblick über Stand und Entwicklung der Forschung
1.7 Hypothesen und Fragestellung dieser Untersuchung

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere
2.1.1 Tierhaltung
2.1.2 Narkose und Tötung
2.1.3 Operationstechnik
2.2 Substanz
2.3 Versuchsplan
2.3.1 Injektionstechnik
2.4 Morphologische Untersuchungen
2.4.1 Paraffinhistologie
2.4.2 Methylmethacrylateinbettung, Hartschnittmikrotomie
2.5 Hämatologische Untersuchungen
2.6 Laborchemische Untersuchungen

3. Ergebnisse

3.1 Ablagerungsmuster im Kaninchenorganismus
3.1.1 Leber
3.1.2 Milz
3.1.3 Lunge
3.1.4 Knochenmark
3.2 Veränderungen der Ablagerung in Monatsfrist
3.3 Laborwerte
3.3.1 Leberenzyme
3.3.2 Blutbild
3.4 Unerwartetes Verenden von Versuchstieren

4. Diskussion

4.1 Vergleich im Ablagerungsmuster von Ratte und Kaninchen
4.2 Laborwerte
4.3 Besondere Merkmale der Ablagerung und deren Abnahme nach Milzexstirpation

5. Zusammenfassung

6. Literatur

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Fluorocarbone in der Medizin

Obwohl es heute möglich ist, Bluttransfusionen in größerem Umfang weitgehend gefahrlos durchzuführen, ergeben sich zahlreiche Probleme:

a) Inkompatibilität zwischen Spender- und Empfängerblut
b) Risiko der Krankheitsübertragung (z.B. Hepatitis)
c) begrenzte Haltbarkeit der Blutkonserven
d) eingeschränkte Verfügbarkeit ausreichender Mengen
e) Aufwendigkeit des Verfahrens und damit verbundene hohe Herstellungskosten

Seit über 20 Jahren wird in verschiedenen Laboratorien an der Herstellung eines synthetischen Blutersatzes gearbeitet, welcher in seinen komplexen Eigenschaften dem menschlichen Vollblut vergleichbar wäre, doch sind die bisher erzielten Produkte für den klinischen Einsatz noch nicht voll befriedigend. Gegenwärtig liegt der Schwerpunkt der Forschung bei den stromafreien Hämoglobinen und den Fluorocarbonen.

Plasma-Ersatzmittel wie Dextrane, Gelatinepräparationen, Hydroxy-Äthylstärke und Polyvinylpyrollidon sind zur Volumensubstitution und Verbesserung der Mikrozirkulation gut geeignet. Bisher waren keine Stoffe gefunden worden, die in vivo die CO_2- und O_2-Transport-funktion der Erythrozyten ersetzen könnten. Flüssigkeiten, die Sauerstoff in genügender Menge physikalisch lösen, z.B. Äthyläther, Aceton oder Tetrachlorkohlenstoff sind für den menschlichen Organismus toxisch.

Das Problem des Gastransportes schien lösbar, als entdeckt wurde, daß die Substanzgruppe der Perfluorochemicals (PFC) eine hohe reversible Bindungskapazität für die Gase O_2, N_2, CO_2 und CO besitzt.

Nachdem Clark et al. (1966) ihre Verwendung bei Säugetieren demonstrierten, sind diese Substanzen seit nunmehr 18 Jahren Gegenstand experimenteller Untersuchungen.

Die Frage nach den Einsatzmöglichkeiten in der Humanmedizin ist dabei von besonderer Bedeutung.

Als Schwerpunkte stellte Geyer (1974) zusammen:

1. bei Anämien unterschiedlicher Genese, z.B. aplastische Anämie, Sichelzellerkrankung, hämolytische Anämie und Anämien als Folge von Tumorerkrankungen.
2. bei anaeroben Infektionen, z.B. Tetanus

3. bei Blutverlusten in der Chirurgie, vor allem bei extrakorporaler Zirkulation und in hämorrhagischen Notfällen
4. bei Schock zur Verbesserung der Mikrozirkulation
5. bei Gefäßverschlüssen nach Thrombose, bei Arteriosklerose und nach Herzinfarkt
6. in der Chemo- und Immunotherapie bei malignen Erkrankungen
7. zum Auswaschen von Toxinen, Viren und Drogen
8. zur isolierten Organperfusion in situ
9. zur Entfernung von Antikörpern vor Organtransplantationen
10. bei Kohlenmonoxydvergiftung
11. transbronchiale Anwendung zur Verhinderung der Dekompressionserkrankungen bei Tauchern und Raumfahrern
12. in der Veterinärmedizin
13. experimentell als Hilfsmittel auf verschiedensten Gebieten in vitro und in vivo.

Ferner erregt diese Substanz das besondere Interesse bei Personen, welche aus religiöser Überzeugung die Transfusion menschlichen Blutes ablehnen.

Vor einem möglichen Einsatz sind folgende Anforderungen an die Fluorkohlenwasserstoffe zu stellen (Zit. n. Beisbarth, 1974):

1. aus leicht erhältlichen Substanzen herzustellen
2. maßgeschneiderte, wohlbekannte Zusammensetzung
3. unproblematische, evtl. langfristige Lagerungsfähigkeit
4. in großen Mengen einsetzbar
5. keine Unverträglichkeitsreaktionen mit den Blutgruppen und -untergruppen
6. Einsparung von natürlichem Blut und Blutfraktionen
7. dürfen die natürlichen Blutbestandteile nicht verändern und müssen beim Umgang damit selbst ihre ursprünglichen Eigenschaften beibehalten
8. keine Überempfindlichkeitsreaktionen
9. keine Gefahr der Krankheitsübertragung
10. sichere Möglichkeit, Medikamente zuzusetzen
11. auch andere Gase als O_2 und CO_2 können transportiert werden
12. müssen nach Erfüllung ihrer Mission den Körper möglichst rasch wieder verlassen.

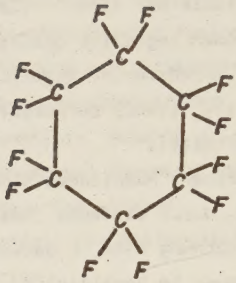
1.2 Eigenschaften und Pharmakokinetik der Fluorocarbone

Fluorocarbone sind synthetisch gewonnene, wasserunlösliche, biologisch und chemisch inerte Kohlenwasserstoffe, deren H-Atome abgespalten und vollständig durch Fluor substituiert werden. Das dabei entstehende Energiegefälle führt jedoch zu einer schlecht reproduzierbaren "Mischung", die anschließend in aufwendigen Schritten gereinigt werden muß. Dies gelingt nur teilweise, da einige der Kontaminationen nicht einmal identifizierbar sind. (Le Blanc et al., 1981). In Frankreich soll es inzwischen angeblich gelungen sein, Blutsubstitutionsmittel mit erheblich verbesserten Eigenschaften zu entwickeln. Dabei haben Le Blanc et al. (1982) herausgefunden, wie man Tetrafluoräthylen zu PFC weiterverarbeitet.

Mit einer begrenzten Anzahl chemischer Reaktionen sind so O_2-Träger herzustellen, deren Reinheitsgrad durch einfache Destillation 99,9% überschreitet. Das unter der Bezeichnung F-44 E patentierte PFC ist nicht nur atoxisch, sondern soll - auch im Vergleich zu japanischen und amerikanischen Vorgängern - die höchste bisher bekannte Gasauflösungskapazität aufweisen. Mit der Substanz wird ferner eine bessere Emulsionsstabilität als beim Fluosol erzielt. Die Ausscheidungscharakteristik wird als sehr befriedigend bezeichnet: die Halbwertszeit beträgt etwa eine Woche.

Kein Fortschritt im Vergleich zum Fluosol-DA wurde im Hinblick auf das Ziel erreicht, das "künstliche Blut" lange lagern zu können und - ohne Gefrierung - bei $-25^{\circ}C$ einen einfachen Transport und leichte Verfügbarkeit zu garantieren.

Das spezifische Gewicht der Fluorocarbone liegt zwischen 1,5 und 2, das Molekulargewicht zwischen 250 und 700. Aufgrund extrem geringer intermolekularer Kräfte besitzen sie einen tiefen Siedepunkt und eine geringe Oberflächenspannung, was ihre hohe Benetzungsfähigkeit erklärt. Die größte Bedeutung erlangten bisher Perfluorodecalin (FDC) und Perfluorotripropylamin (FTPA), beides Bestandteile des hier angewandten Fluosol-DA 20% (s. Abb. 1).



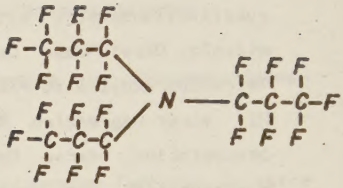


Abb.1: Perfluorodecalin (FDC) Perfluorotripropylamin (FTPA)

Das Sauerstoffbindungsvermögen dieser Substanzen zeigt eine zum Sauerstoffpartialdruck lineare Korrelation, während die O_2 Bindungskurve des Hämoglobins einen sigmoidalen Verlauf aufweist.

Bei dem normalerweise in den Alveolen herrschenden Sauerstoffpartialdruck von 100 mm Hg werden vom Blut 20 Vol.% O_2 aufgenommen, von Fluosol-DA 20% dagegen nur etwa 2 Vol.%. Um die Sauerstoffmenge annähernd zu erreichen, die physiologischerweise bei Partialdruckdifferenzen von 50 mm Hg zwischen venösem und arteriellem Schenkel vom Blut aufgenommen bzw. abgegeben wird, sind bei FDA - 20% Partialdruckdifferenzen von 500 mm Hg erforderlich. Ein ausreichender Sauerstofftransport von den Lungen zur Peripherie ist daher nur möglich, wenn der Partialdruck des O_2 in den Alveolen hoch genug ist. Für FDA 20% wäre dies bei 95% O_2 in der Atemluft der Fall (Naito et al., 1978) . Die Transportkapazität für CO_2 liegt bei den Fluorocarbonen um den Faktor 3 - 4 über der des Sauerstoffes.

1.3 Probleme der Emulsion

Durch das Unvermögen, sich in Wasser zu lösen, würden die fluorierten Kohlenwasserstoffe bei intravenöser Anwendung sofort zu Embolien führen. Deshalb ist es notwendig, sie als Emulsion zu verabreichen, um eine Dispersion von Teilchen mit geeigneter Größe zu gewährleisten und damit die Emboliegefahr zu verhindern.

In vielen Arbeiten (Naito et al., 1978; Fujita et al.,1973 u.a.m.) wurde auf den Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Toxizität der Substanzen hingewiesen. Einerseits würden Teilchen, deren Durchmesser über dem eines Erythrozyten liegt, die Kapillaren verstopfen und darüberhinaus schneller aus der Blutbahn eliminiert werden als kleinere (Geyer et al., 1968; Geyer, 1970), andererseits erhöht sich die Viskosiät mit Abnahme der Teilchengröße (s. Abb. 2).

Probe	Anteil der Partikel > 0,4 µ	LD_{50} g/kg 72 Std
1	25 %	11,5
2	3 %	27,0
3	0	30,3

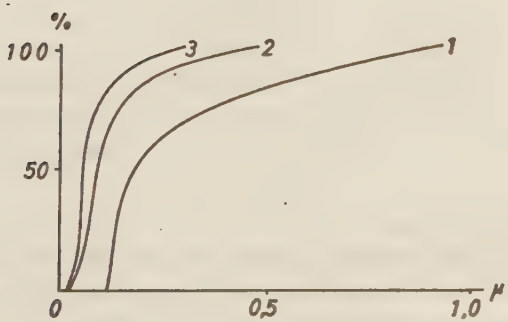


Abb. 2: Zusammenhang zwischen Partikelgröße und akuter Toxizität von FC-43 Emulsion in Ratten. (modifiziert nach Fujita et al., 1973).

Als Emulgatoren werden bevorzugt synthetische Polyoxyäthylen-Polyoxypropylen-Polymere ("Pluronics") eingesetzt.
Pluronic-F-68, ein Block-Polymer-Polyol (MG 8.350), das bei einer Konzentration von 2,5 Gew.% mit Serum isoonkotisch ist, ruft keine Hämolyse hervor und wirkt erst in sehr hohen Konzentrationen toxisch. Darüberhinaus finden Eiphosphorlipide zur Emulgierung Verwendung, die leicht im Körper metabolisiert werden. Durch ihren onkotischen Druck wirken diese Sustanzen zusätzlich als Plasmaexpander.
Die vollständige Zusammensetzung von Fluosol-DA 20% zeigt Tabelle 1.

Tab. 1. Zusammensetzung von Fluosol-DA 20% (verändert nach Geyer, 1981)

	Gew.%	Funktion
Perfluorodecalin	14,0	O_2- und CO_2-Transport
Perfluorotripropylamin	6,0	" "
Pluronic-F-68	2,7	Emulgator,onkotischer Druck
Eiphospholipide	0,4	" "
Glycerin	0,8	" "
Hydroxyäthylstärke	3,0	Kolloidosmotischer Druck
NaCl	0,60	Essent. Ion, osmot. Druck
KCl	0,34	" "
$MgCl_2$	0,02	" "
$CaCl_2$	0,03	" "
$NaHCO_3$	0,21	Pufferkapazität
Glucose	0,18	Energiequelle

1.4 Ausscheidungsmechanismus

Auf Grund ihrer chemischen Inertheit dürften die Fluorocarbone den Körper ohne Verstoffwechselung verlassen. Die Abatmung über die Lunge (Dampfdruck für FDC bei 37°C: 12,7 mm Hg, für FTPA: 18,5 mm Hg) steht bei den Fluorocarbonen im Vordergrund. Zu einem geringen Anteil (ca. 1 %) konnte die Substanz in den Gallenwegen und in den Schweißdrüsen nachgewiesen werden. Ausscheidung über die Nieren wurde auf Grund der Partikelgröße (20,1 µ)und ihrer metabolischen Trägheit in keinem Fall beobachtet (Yokoyama et al., 1975).

1.5 Probleme der Ablagerung

Von mehreren Forschergruppen (Clark et al., 1973; Masuda et al., 1973; Ohyanagy et al.,1974 und 1975; Yokoyama et al., 1974; Yamanouchi et al., 1975) wurde die Speicherung der unterschiedlichen Fluorocarbonverbindungen in verschiedenen Organen mittels gaschromatographischer Analysen bestimmt. Mit Suspensionen, deren Partikelgröße weniger als 0,2 µm beträgt ließen sich die besten Erfolge erzielen (Naito et al., 1978).

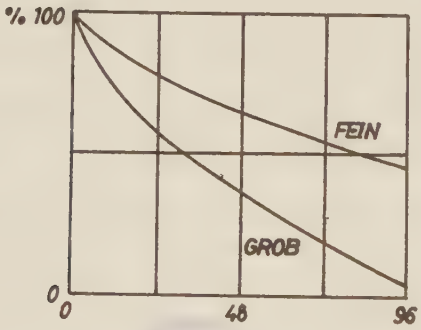


Abb. 3. Retention von PFC-Emulsionen im Blut von Kaninchen in Abhängigkeit von der Teilchengröße (modifiziert nach Naito et al., 1978).

Daraus ließ sich eine intracorporale Halbwertszeit (ein Mehrfaches der intravasalen HWZ) und eine Ausscheidungskonstante für die verschiedenen Fluorocarbone ermitteln. Die intracorporale HWZ ist um so geringer, je höher der Dampfdruck ist; z.B. für Fluosol-43 895,2 Tage, für FDC 7,2 Tage (Okamoto et al., 1973 und 1975, Yokoyama et al., 1978).
Orte der maximalen Speicherung sind dabei Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark. In anderen Organen wie Lunge und Niere lassen sich nur kleine Substanzmengen nachweisen,die nach kurzer Zeit verschwunden sind. Bereits kurz nach Injektion fanden sich in den untersuchten Organen (Lunge, Leber, Milz) mittelgroße Makrophagen, die ein

schaumartig aufgelockertes Zytoplasma aufwiesen. Bei starker Vergrößerung erkannte man, daß es sich um eine Ansammlung von Vakuolen handelte. In der Sudan IV-Färbung am Kryostatschnitt sah man an entsprechender Stelle Substanz, die sich allerdings nicht anfärbte. Die Vakuolen erwiesen sich als Äquivalente für die in der histologischen Präparation herausgelösten Substanzen (Pfannkuch u. Schnoy, 1979).
Da die chemische Stabilität der Fluorocarbone außer Zweifel steht, stellt sich die Frage, ob durch diese Speicherphänomene bei längerer Überlebenszeit chronische Organveränderungen oder Funktionsstörungen im Retikuloendothelialen System provoziert werden.
Masuda et al. (1973) erwähnten bei längerem Überleben der Tiere in der Leber eine Proliferation der von Kupfferschen Sternzellen und das Auftreten von Fibroblasten. Offenbar kommt es auch in der Milz zu einer allgemeinen Zellvermehrung, da, nach Hauk et al. (1977) , die Gewichtszunahme ebenfalls größer ist, als durch die Substanzeinlagerung allein zu erwarten wäre.
Die o.g. relativ langen Speicherzeiten im Organismus dürften u.a. für die Anwendung am Menschen der limitierende Faktor sein .

1.6 Überblick über Stand und Entwicklung der Forschung

Erste Versuche Fluorocarbone für medizinische Zwecke zu verwenden unternahmen Gollan und Clark (1966), mit der Perfusion eines isolierten Rattenherzens. Wenig später wurde von Sloviter und Kamimoto (1967), sowie Sloviter (1975) über die Perfundierung eines Rattenhirns berichtet. 1968 demonstrierten Geyer et al. verschiedentlich den weitgehenden, ja vollständigen Blutaustausch durch Fluorocarbonemulsionen unter verschiedenen Bedingungen am lebenden Versuchstier (Geyer, 1970, 1973;Clark et al., 1970).
Inzwischen verfügen verschiedene Laboratorien über Versuchstiere (Mäuse, Ratten, Hamster, Frösche, Hunde, Katzen, Kälber, Schweine, Affen und Kaninchen), die nach zum Teil wiederholten Infusionen und weitgehendem Austausch von Blut gegen Fluorkohlenwasserstoffe über mehrere Jahre leben, ohne einen offensichtlich krankhaften Befund zu zeigen.
Untersuchungen auf kanzerogene, teratogene und mutagene Eigenschaften wurden durchgeführt (Hayashi et al., 1973; Ohyanagy et al., 1973; Okamoto et al., 1975; Rosenblum et al., 1976; Sloviter, 1975). Eine zusammenfassende Darstellung findet sich bei Schnoy et al., (1979).
Seit einiger Zeit werden in Japan und den USA Versuche am Menschen

durchgeführt (Ohyanagy et al., 1979; Lapin et al., 1980; Tremper et al., 1980; Watanabe et al., 1981; Sada et al., 1981; Oyama et al., 1981 u.a.m.).

1.7 Hypothesen und Fragestellung dieser Untersuchung

Seit 1976 werden am Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Charlottenburg der FU Berlin mehrfach experimentelle Arbeiten zur Fluorocarbonanwendung betrieben. Bevorzugtes Versuchstier ist die Wistarratte. Wie aus der Arbeit von Hoffarth (1982) hervorgeht, die über einen Zeitraum von 12 Monaten an 94 männlichen Wistarratten z.T. wiederholt hochdosierte Fluosolinjektionen (und zwar FDA 20%, FDA 35% und Fluosol-43) vorgenommen hat, fanden sich als Hauptablagerungsstätten Leber und Milz. Die Tiere boten während der gesamten Versuchsdauer ein völlig normales Verhalten und schienen auch bei hohen Fluosolkonzentrationen in ihren Vitalfunktionen nicht beeinträchtigt.

Bei der Sektion fanden sich, abhängig von Häufigkeit, Konzentration und Dauer der Fluosolanwendung, drastische Gewichtszunahmen bei Leber und Milz. Bei der Milz betrug es bis zum Zehnfachen des normalen Milzgewichtes. Da die Ratte als besonders widerstandsfähiges Tier hinreichend bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit eine vergleichsweise weniger resistente und sensiblere Tierspezies eingesetzt werden. Beim Literaturstudium fiel auf, daß nur in vereinzelten Fällen mit Kaninchen gearbeitet wurde (Kitazawa et al., 1982, Endrich et al., 1980, Czekelius, P., 1981, Motta et al., 1982, Tauber et al., 1981, Vercelotti et al., 1982), und der größte Teil der Versuche von kürzerer Dauer war als in der hier vorliegenden Arbeit.

Unter dem Gesichtspunkt, daß die Milz Hauptablagerungsstätte für Fluorkohlenwasserstoffe ist, sollte erforscht werden:

1. Wie reagiert der Organismus, dem die Milz entfernt und 10 Tage danach Fluosol-DA 20% zugeführt wird?
   a. Rein hypothetisch könnte sich die Substanz länger im Gefäßsystem aufhalten, da ein wichtiges Filter fehlt.
   b. Welche Auswirkungen ergeben sich dadurch für das Blutsystem, z.B. in der Zusammensetzung der einzelnen Blutfraktionen?
   c. Durch den längeren intravasalen Verbleib bestünde die Möglichkeit, daß Fluorocarbon in kürzerer Zeit vermehrt über die Lungen, dem bevorzugten Ausscheidungsorgan, abgeatmet wird und daraus für den Atmungsapparat eine nicht erwünschte Mehrbelastung resultiert.

d. Vorteilhaft wäre dabei, daß der Organismus schneller von der Substanz befreit würde.

e. Ist als Ausdruck beschleunigter Abatmung an der Lunge ein morphologisches Korrelat in Form von Makrophagenvermehrung und/oder FC-Vakuolen feststellbar?

f. Andererseits wäre denkbar, daß die Leber ihre Speicherkapazität für FDA erhöht und den zusätzlich anfallenden "Milzanteil" aufnimmt und somit einer höheren Belastung ausgesetzt ist.

2. Mit welchen Auswirkungen ist zu rechnen, wenn das Tier Fluosol erhalten hat und anschließend, am 10. Tag post injectionem, eine Splenektomie durchgeführt wird?

a. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß ein Großteil der gespeicherten Substanz sofort eliminiert wäre.

b. Die Entspeicherung würde insgesamt problemloser, da weniger FDA abgeatmet und somit die Lungen einer geringeren Belastung ausgesetzt würden.

3. Ist damit zu rechnen, daß die milzexstirpierten Tiere in ihrer Resistenzlage soweit geschwächt sind, daß in den entsprechenden Versuchsgruppen vermehrt Todesfälle auftreten, oder ist das Vorhandensein bzw. der Verlust der Miz von untergeordneter Bedeutung?

Fragestellung im Einzelnen:

1. Bevorzugte Lokalisation der Fluosol-Speicheräquivalente
   Leber: Sinusoide, Portalfelder, zentral, peripher, intrazellulär
   Milz : Pulpa, Follikel
   Lunge: Gefäßwände von Pulmonalarterien, intraalveolär

2. Ausmaß und örtliche Verteilung der Speicherung
   mäßig, vereinzelt, diffus verteilt, konfluierend, herdförmig, hochgradig

3. Mögliche Organveränderungen
   Leber: Stauungszeichen, Schwellung, Verfettung, Leberzellnekrose
   Milz : Stauung, Speicherungsphänome
   Lunge: Stauung, Gefäßveränderungen

Die Überlegungen, die zur Auswertung im Doppelblindverfahren führten, waren folgende:

1. Ist es durch die histologische Betrachtung möglich, festzustellen, ob in den Leberpräparaten der milzlosen Tiere vergleichsweise mehr Fluosol zu finden ist, als in anderen Gruppen? Finden sich u.U. vermehrt Leberschäden?

2. Gibt es Unterschiede im Speicherungsmuster der Milzen, die nur 10 Tage mit FDA belastet sind im Gegensatz zu den Milzen, die theoretisch 30 Tage lang Fluosol speichern und entspeichern können?

3. Bieten die Lungenpräparate der milzlosen Tiere Hinweise dafür, ob ein Fehlen der Milz durch evtl. beschleunigtes Abatmen der Substanz vermehrt Lungenschäden auftreten?
Werden möglicherweise geringere Lungenschäden gefunden, wenn mit einer nach Fluosolanwendung durchgeführten Splenektomie ein Großteil der gespeicherten Substanz sofort entfernt wird und somit nicht über die Lunge abgeatmet werden muß?

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Es wurden mischrassige Kaninchen sowie einige Neuseeländer und Sandy-lop Arten verwendet. Es waren ausschließlich männliche Tiere mit einem Gewicht zwischen 2,5 und 3,0 kg. Bezugsquelle war das Bundesgesundheitsamt für Veterinärmedizin, Unter den Eichen 82, 1000 Berlin 45.
Vor Versuchsbeginn wurden alle Tiere mit der Hauptner-Tätowierzange im rechten Ohr gekennzeichnet.

2.1.1 Tierhaltung

Die Tiere waren in Einzelkäfigen im Versuchstierhaus des Universitätsklinikums Charlottenburg untergebracht. Die Nahrung bestand aus Altromin Standard-Diät für Kaninchen, Möhren und Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur lag zwischen 19° und 23° C.

2.1.2 Narkose und Tötung

Zur Narkotisierung vor Splenektomie und Fluosolgabe wurde den Tieren 25 mg Ketanest^{R} und 0,3 mg Rompun^{R} pro kg Körpergewicht intramuskulär in den Oberschenkel eines Hinterlaufes injiziert. Zur Tötung erhielten die Tiere zusätzlich zu den o.a. Mengen 100 mg Ketanest^{R} intracardial.

2.1.3 Operationstechnik

Narkose (vorausgegangen war eine zweitägige Nahrungskarenz), Rasur des Felles auf der Bauchseite, Desinfektion des Operationsgebietes mit Polyvidon-Jod 10%, sterile Abdeckung. Schnitt in der Linea alba vom caudalen Ende des Brustkorbes bis Mitte Abdomen (ca. 5 cm), Aufsuchen der Milz im linken oberen Quadranten. Die Milz ist am Mesenterium fixiert und in der Regel von 5-8 arteriellen und venösen Blutgefäßpaaren versorgt. Alle Abzweigungen der A. und V.lienalis wurden paarweise doppelt unterbunden (Catgut^{R} 4-0, Ethicon) und durchtrennt. Anschließend Milzentnahme. Zur Adhäsionsprophylaxe Spülung des Bauchraumes mit 10 ml körperwarmer NaCl-Lösung 0,9%. Peritoneum und Bauchmuskeln wurden gleichzeitig mit durchgehender Naht (Vicryl 3-0, Ethicon) verschlossen. Der Hautverschluß erfolgte mit Einzelknopfnähten (Mersilene 3-0, Ethicon). Wunddesinfektion mit Polyvidon-Jod 10 % und Heftpflasterverband. Während der Splenektomie wurde zusätzlich eine

Leberbiopsie vorgenommen.

2.2 Substanz

Verwendet wurde Fluosol-DA 20% (Hersteller: The Green Cross Corporation, 1-47, Chuch 1-Chome, Joto-Ku, Osaka, Japan. Chargennr. 037 GD. Herstellungsdatum: 5.1.1982. Vertrieb für Deutschland: Fa. Pfrimmer,8500 Erlangen, Hofmannstr. 27).
Die Tiere erhielten 20 ml pro kg Körpergewicht, was einer Konzentration von 4g/kg Körpergewicht dieser Substanz entspricht.

2.3 Versuchsplan

Es wurden insgesamt 21 Kaninchen in fünf Versuchsgruppen aufgeteilt (s. Abb.4).

1. Gruppe
4 Versuchstiere. Die Tiere wurden splenektomiert und erhielten am 10.Tag postoperativ 60 ml FDA-20 % unmittelbar nach Entnahme von 30 ml Blut durch Herzpunktion. Vier Wochen nach Fluosolgabe wurden die Tiere getötet.

2. Gruppe
4 Versuchstiere. Injektion von 60 ml Fluosol wie beschrieben. Versuchsdauer 4 Wochen.

3. Gruppe
4 Versuchstiere erhielten je 60 ml FDA-20 % und wurden 10 Tage danach milzexstirpiert. 4 Wochen nach Fluosolgabe erfolgte die Tötung.

4. Gruppe
4 Kontrolltiere. Entnahme von 30 ml Blut und Transfusion von 60 ml physiologischer Kochsalzlösung. Versuchsdauer 4 Wochen.

5. Gruppe
3 Kontrolltiere. 10 Tage nach Splenektomie erhielten die Tiere 60 ml 0,9 % ige NaCl-Lösung, nachdem ihnen zuvor 30 ml Blut entnommen wurde. Nach Ablauf von 4 Wochen wurden diese Tiere getötet.

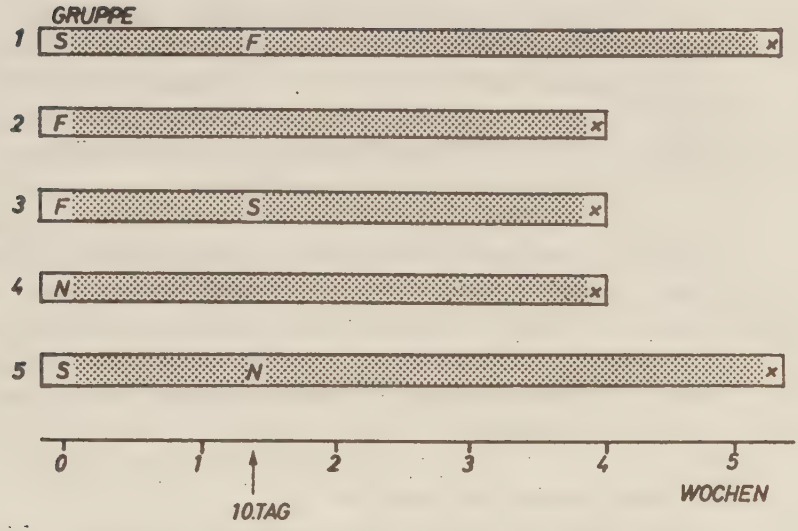


Abb. 4: Versuchsplan (S= Splenektomie, F= Fluosolinjektion, N= NaCl-Gabe, X= Versuchsende)

2.3.1 Injektionstechnik

Nach Narkotisierung der Tiere (wie unter 2.1.2 beschrieben) wurde eine Herzpunktion durchgeführt (Abbocath, T, 18G) und 30 ml Blut entnommen. Anschließend wurde das auf 35°C vorgewärmte Fluosol langsam (in ca. 15 Min) intracardial injiziert. Analog wurde bei den Kontrolltieren eine NaCl-Injektion durchgeführt.

2.4 Morphologische Untersuchungen

Lunge, Leber, Milz und Knochenmark wurden makroskopisch und lichtmikroskopisch auf pathologische Veränderungen hin untersucht.

2.4.1 Paraffinhistologie

Fixierung der o. g. Organe für 24 Stunden in Formalin, anschließend Wässerung über 3 Stunden. Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (80%,90%, absolut) und Xylol. Zweimalige Behandlung mit Paraplast. Nach Einbettung in Paraffinblöcke Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, Masson-Goldner,PAS und van Gieson.

2.4.2 Methylmethacrylateinbettung, Hartschnittmikrotomie

Fixierung des Materials in Schaffer-Lösung (96 ml Methanol, 4 ml Glucose-Phosphat-Puffer, 50 ml Formol 37%) für 24 Stunden. Danach weitere Lagerung für 24 Stunden in Methanol und anschließende Einbringung in Methylmethacrylat. Nach 24stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank erfolgte die Polymerisierung im Brutschrank bei 30°C für 2 - 3 Tage. Anschließend wurden mit dem Hochleistungsmikrotom (Zeiss) 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einem gelatinebeschichteten Objektträger aufgezogen und mit 96% Alkohol gestreckt. Bei 70° mit einem Gewicht beschwert, auf der Wärmeplatte getrocknet. Dann 40 Minuten in Benzol entacryliert. Aufsteigende Alkoholreihe: Benzol, Methylbenzoat, absoluter Alkohol, 96%, 80% Alkohol, Aqua-dest. Dann 24 Stunden in Gallocyanin gebeizt. Färbung nach Giemsa und Masson-Goldner.

2.5 Hämatologische Untersuchungen

Von den aus den Herzpunktionen gewonnenen 30 ml Blut (s.2.3.1.) wurden 4 ml zur Bestimmung eines Differentialblutbildes in eine EDTA-Monovette gefüllt. Zur Hämatokrit-Bestimmung wurden die allgemein üblichen Hämatokritkapillaren verwendet.

Unmittelbar nach erfolgter Fluosolinjektion wurden 0,5 ml Blut entnommen und daraus der "Fluorokrit" (Mitsuno et al.,1981) bestimmt. Die Blutprobe wurde in eine Hämatokritkapillare gebracht und diese 10 Minuten lang bei einer Umdrehung von 2000 U/min. zentrifugiert. Der Fluorokrit, welcher sich als weißliche Säule oberhalb der korpuskulären Blutbestandteile absetzt, war, ähnlich dem Hämatokrit, in Volmenprozent abzulesen.

2.6. Laborchemische Untersuchungen

Zur Bestimmung von OT, PT, gammaGT, alkalische Phosphatase, LDH und alpha HBDH wurden Einweg-Meßküvetten mit 0,5 ml Blut beschickt. Bei einer Umdrehung von 10.000 U/min. wurde 2 Minuten zentrifugiert und anschließend das Blutplasma zur weiteren Verarbeitung abpipettiert.

3. Ergebnisse

3.1 Ablagerungsmuster im Kaninchenorganismus

3.1.1 Leber

Bei der Sektion findet sich in zwei Lebern aus der Gruppe 1(Splenektomie und anschließende Fluosolgabe) folgender makroskopischer Befund:
Die gesamte Leberoberfläche ist von kleinen, weißgrauen, ca. 1 mm langen stäbchenförmigen Einlagerungen überzogen. Bei Anschnitt des Organs finden sich diese Veränderungen über das gesamte Parenchym verteilt. Die Tierlebern aus den Gruppen 2 (30 Tage Fluosol) und 3 (Fluosolapplikation und anschließende Splenektomie) zeigen eine unauffällige Oberfläche, weisen aber auf der Schnittfläche stecknadelkopfgroße weiß-graue Herde auf.

Lichtmikroskopisch finden sich in den Lebern aller mit Fluosol behandelten Tiere vorwiegend portal und in den Sinusoiden mittelgroße Makrophagen (Abb. 5) mit schaumartig aufgelockertem Zytoplasma (Abb. 6). Hierbei handelt es sich um Ansammlungen von Speichervakuolen unterschiedlicher Größe, die z.T. zu regelrechten"Vakuolenpfützen" konfluieren (s. Abb. 7,8). Neben diesen morphologischen Veränderungen finden sich vereinzelt Stauungszeichen und bei allen Tieren, einschließlich der Kontrollgruppen, die nicht mit Fluosol behandelt wurden, eine fein- bis grobtropfige Leberverfettung (Abb. 9). Ansonsten findet sich bei den Kontrolltieren eine regelrechte Zellstruktur (Abb. 10).
Bei den vor Fluosolgabe splenektomierten Tieren läßt sich in den Lebern histologisch ein vergleichsweise höherer Fluosolspeicheranteil nachweisen. Mögliche Organveränderungen im Sinn einer Leberzellnekrose finden sich nicht.

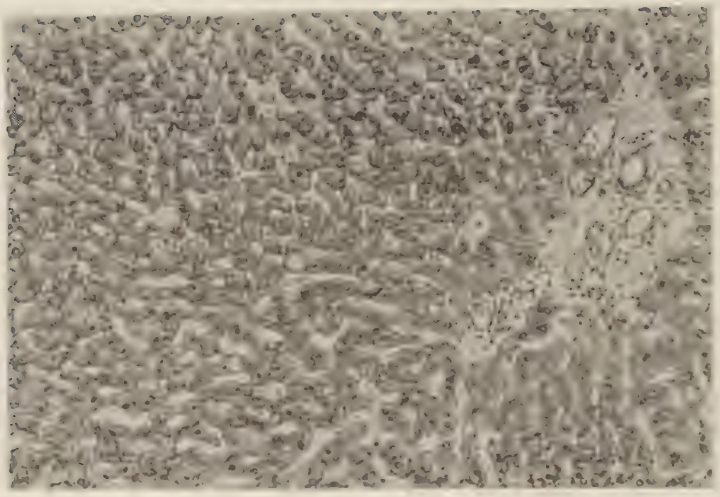


Abb. 5: Leber eines Tieres aus Gruppe 3. Im Portalfeld und sinusoidal mittelgroße Makrophagen.
(Methylmethacrylat; Masson-Goldner, Objektiv 10x)

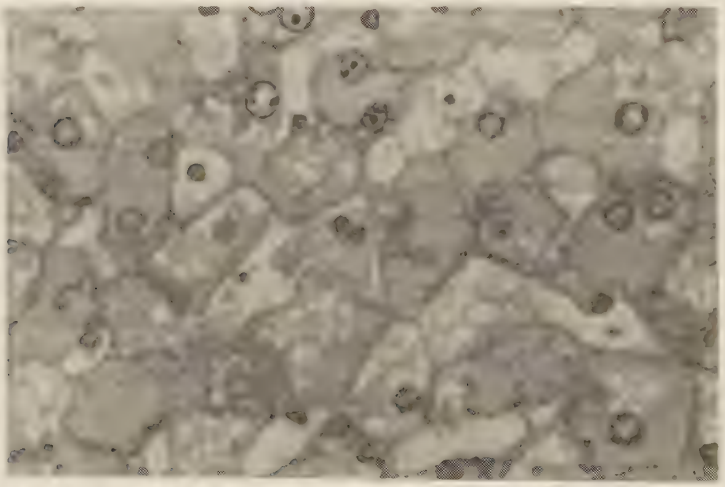


Abb. 6: Leber eines Tieres aus Gruppe 1. Substanzspeichernde Makrophagen mit schaumartigem Zytoplasma.
(Methylmethacrylat; Giemsa, Objektiv 40x)

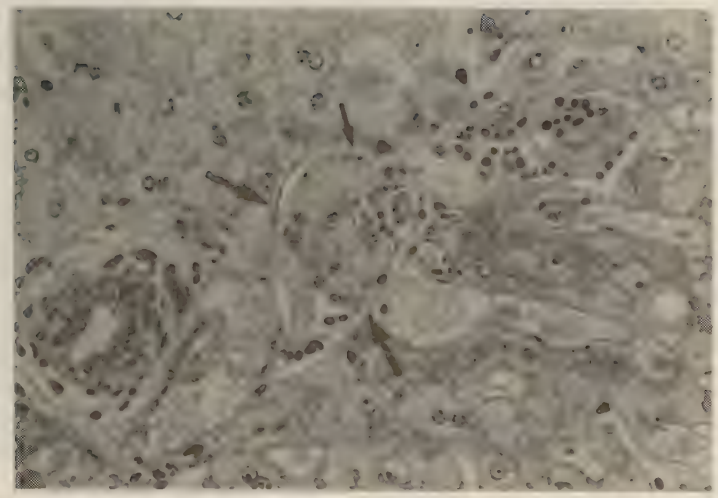


Abb. 7: Leber eines Tieres aus Gruppe 1. Zahlreiche Fluosol-Speichervakuolen in Bildmitte (Pfeile).
(Paraffin; Masson-Goldner, Objektiv 25x)

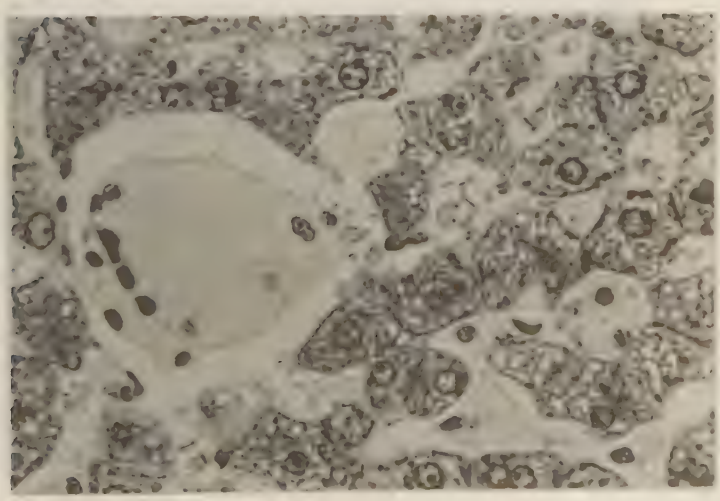


Abb. 8: Leber eines Tieres aus Gruppe 3. Im Portalfeld zahlreiche konfluiert erscheinende Speicherzellen.
(Paraffin; Masson-Goldner, Objektiv 40x)

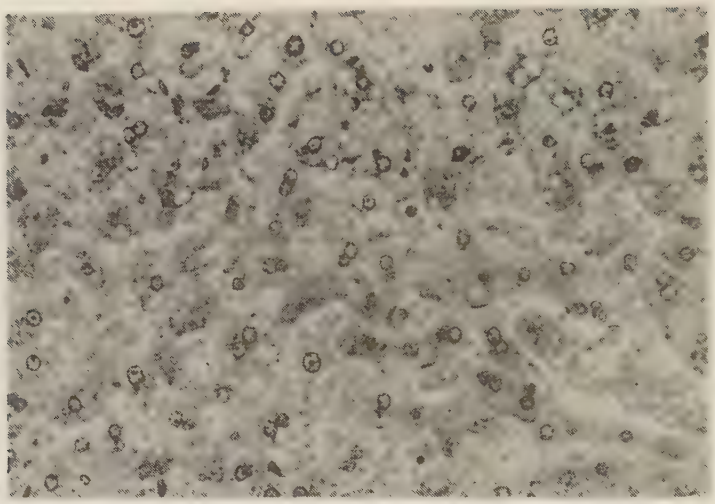


Abb. 9: Leber eines Kontrolltieres. Mitteltropfige Verfettung der Hepatozyten. (Methylmethacrylat; Giemsa, Objektiv 25x)

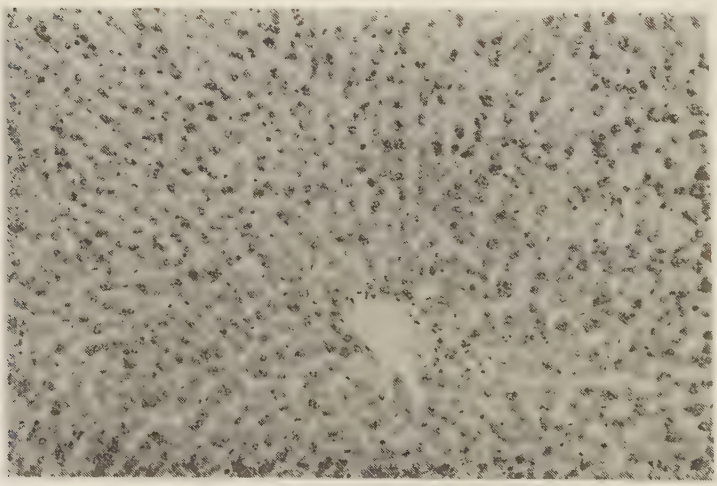


Abb. 10: Leber eines Kontrolltieres. Regelrechte Zellstruktur . (Methylmethacrylat; Giemsa, Objektiv 10x)

3.1.2 Milz

Die Milzen der Tiere aus den Gruppen 2 (30 Tage Fluosol) und 3 (Milzentnahme 10 Tage nach Fluosolapplikation) scheinen bei Splenektomie und Sektion geschwollen. Es finden sich unterschiedlich große, z.T. konfluierende, weiß-graue Herde, die das gesamte Organ durchsetzen.

Die vor FDA-Gabe exstirpierten Milzen (Gruppe 1), wie auch die Milzender Kontrolltiere (Gruppe 4 und 5) zeigen ein histologisch unauffälliges Bild. In Milzen der Gruppe 3, die 10 Tage nach FDA-Injektion entnommen wurden, sieht man nahezu gleichmäßig sowohl in der Milzpulpa, als auch in den Follikeln Makrophagen mit zahlreichen Vakuolen unterschiedlicher Größe (Abb. 11, 12). Nach einem Monat kommt es vor allem in der roten Pulpa zu einer gruppenförmigen Anordnung der Makrophagen, die in den Follikeln nur noch vereinzelt zu finden sind (Abb. 13).

Unterschiede im Speicherungsmuster der Milzen lassen sich bei den einzelnen Versuchsgruppen nicht feststellen.

3.1.3 Lunge

Bei allen Tieren, denen Fluosol appliziert wurde, ist nach Eröffnung des Thorax regelmäßig eine deutliche Blässe und ausgeprägte Überblähung der Lungen festzustellen. Die Lungen kollabieren nicht und weisen eine trocken schwammige Konsistenz auf.

An den Lungenpräparaten der Kontrolltiere (Gruppen 4 und 5) läßt sich kein pathologischer Befund erheben. Sämtliche Lungen der mit FDA behandelten Tiere zeigen Gefäßveränderungen. In den Pulmonalarterien sieht man nach FDA-Gabe eine Vakuolisierung, die zu einer deutlichen Auflockerung des Gewebes führt, die jedoch noch nicht näher interpretiert werden kann. Teilweise finden sich Fluosol-speichernde Makrophagen subendothelial und in der Muscularis (Abb.14, 15).

Vermehrte Lungenschäden durch beschleunigtes Abatmen der Substanz bei fehlender Milz lassen sich nicht nachweisen, eine relative Makrophagen-vermehrung dagegen ist deutlich.

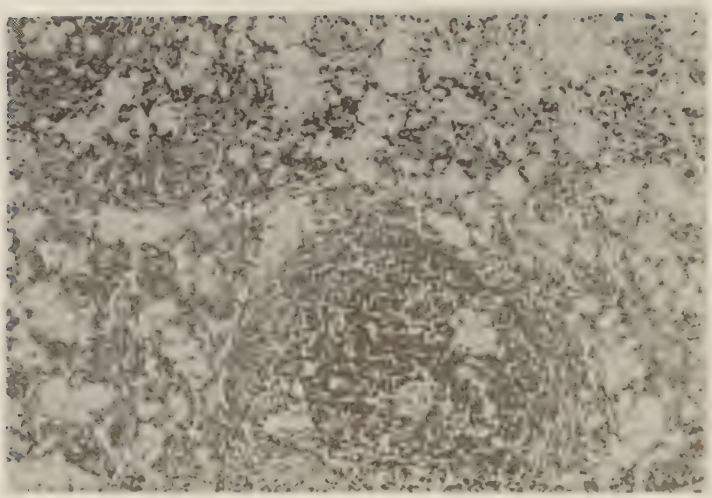


Abb. 11: Milz eines Tieres aus Gruppe 2. Substanzspeichernde Makrophagen gleichmäßig verteilt in Milzpulpa und Follikel. (Paraffin; HE, Objektiv 10x)

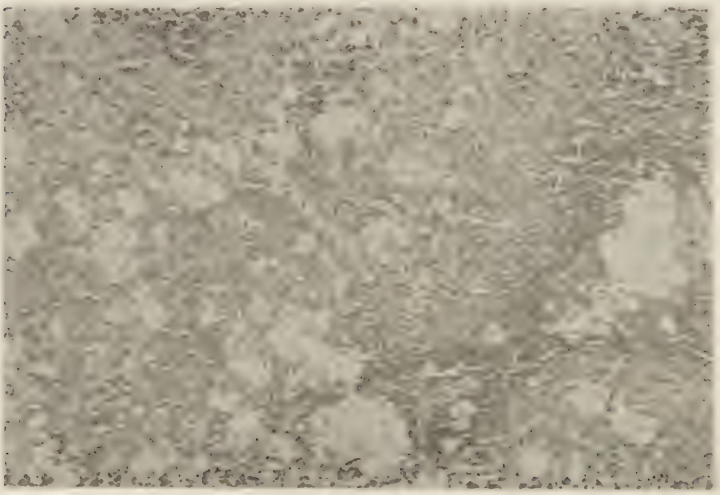


Abb. 12: Milz eines Tieres aus Gruppe 2. Gesamtes Parenchym von Speichervakuolen diffus durchsetzt. (Paraffin; HE, Objektiv 10x)

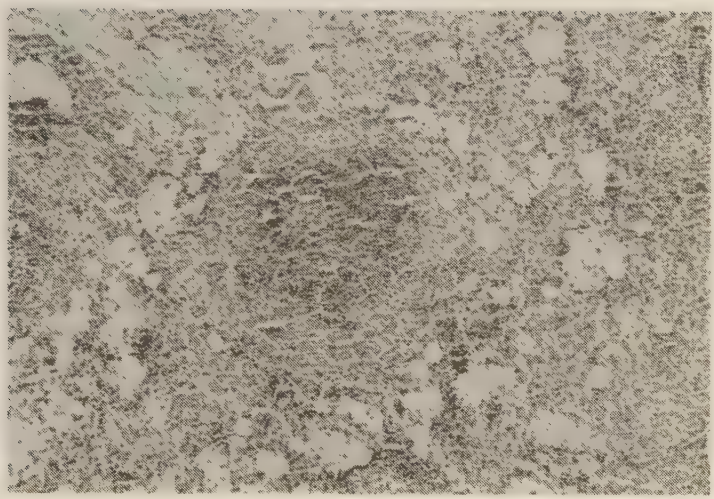


Abb. 13: Milz eines Tieres aus Gruppe 2. Anordnung der Makrophagen in der Milzpulpa. Kein Nachweis in den Follikeln. (Paraffin; HE, Objektiv 10x)

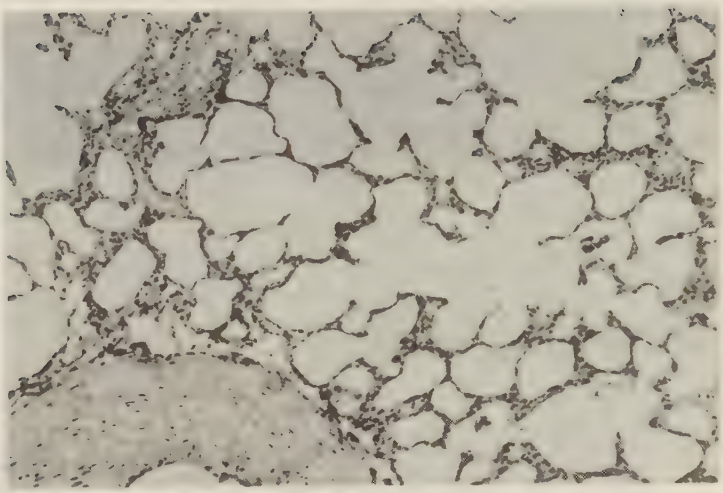


Abb. 14: Lunge eines Tieres der Gruppe 1. Aufgelockerte Muscularis einer Pulmonalarterie und geringe interstitielle Ödeme. (Paraffin; HE, Objektiv 10x)

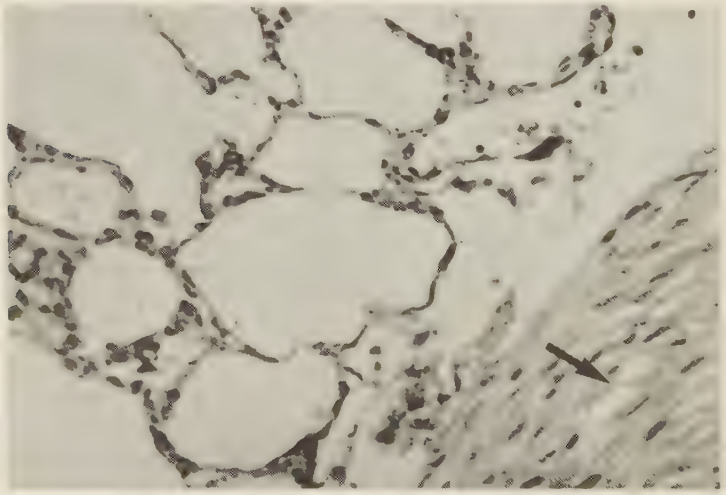


Abb. 15: Lunge eines Tieres der Gruppe 1. Deutliche Vakuolisierung der Wand einer Pulmonalarterie (Pfeil), z.T. ist die schaumige Struktur der Vakuolen erkennbar. (Paraffin; HE, Objektiv 25x)

3.1.4 Knochenmark

Bei den Kontrolltieren (Gruppe 4 und 5) findet sich ein graziles Spongiosabälkchenwerk und weite Markräume. Der Fettgewebsanteil beträgt etwa 60 %. Ausgereifte Erythro- und Granulopoese, mit der für die speziesbedingten eosinophilen Granulierung aller weißer Blutzellen. Die Megakaryozyten sind in Zahl und Form unauffällig (Abb. 16).
Bei den Versuchstieren fällt auf, daß bei vermindertem Fettgewebsanteil die Zelldichte im Mark zunimmt (Verhältniss 1:1). Zytologisch findet sich in den hämatopoetischen Reihen kein pathologischer Befund. Es fallen zahlreiche Makrophagen auf (Abb. 17, 18), die sich von den andernorts gefundenen Makrophagen nicht unterscheiden und aufgrund ihrer Substrukturierung von Fettzellen klar abgrenzbar sind (Abb.19).

3.2 Veränderungen der Ablagerungen in Monatsfrist

Sowohl für die Leber, als auch für die Milz lassen sich Gewichtszunahmen nachweisen (s. Tab. 2 u.3 und Abb. 20 u. 21).
Nach vierwöchiger Fluosolbelastung steigen bei den Tieren, denen die Milz belassen wurde (Gruppe 2), die Lebergewichte um ca. 30 % an. Tiere, die am 10. Tag nach Fluosolinjektion splenektomiert wurden (Gruppe 3), zeigen eine durchschnittliche Steigerung der Lebergewichte von 34 %. Mit einer Zunahme des Lebergewichtes von durchschnittlich 44 % reagieren die Tiere aus Gruppe 1, die 10 Tage nach Milzexstirpation mit Fluosol behandelt wurden.
Nach 10tägiger Fluosolbelastung steigt das Milzgewicht in der Gruppe 3 um 22 %. Nach 30 Tagen liegen die Milzgewichte der Tiere aus Gruppe 2 noch um 19 % über dem Mittelwert. Teile der Substanz sind zu diesem Zeitpunkt offensichtlich wieder aus der Milz entfernt.

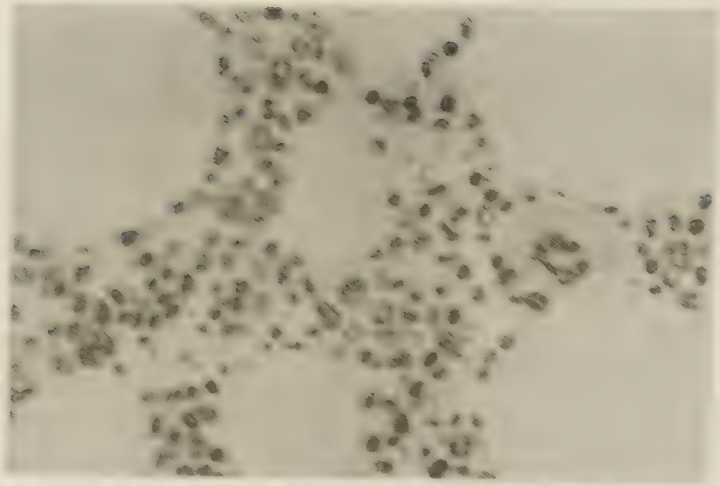


Abb. 16: Knochenmark eines [illegible] Kaninchens, [illegible] und [illegible]. Methylmethacrylat, Hämatoxylin-Eosin, Objektiv 40x/1

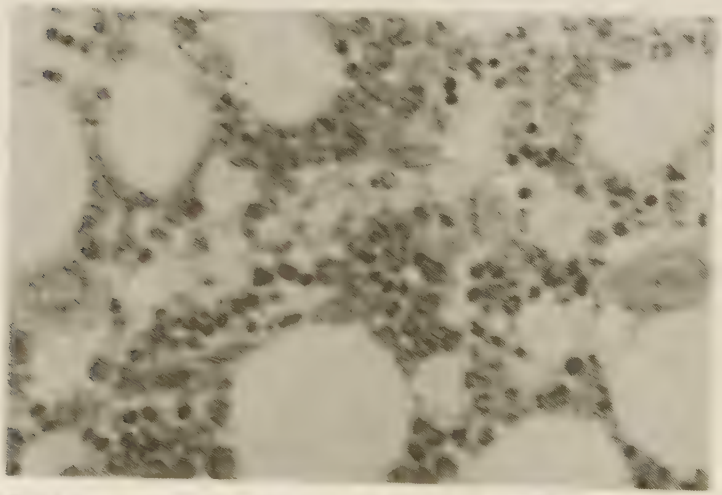


Abb. 17: Knochenmark eines [illegible] Kaninchens, [illegible] und [illegible]. Methylmethacrylat, Hämatoxylin-Eosin, Objektiv 40x/1

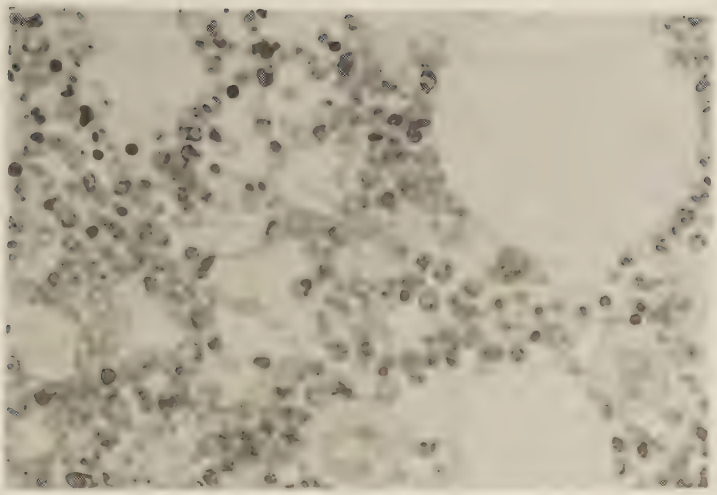


Abb. 18: Knochenmark eines Tieres der Gruppe 3. Massive Ansammlung von "Schaumzellen". (Methylmethacrylat; Giemsa, Objektiv 40x)

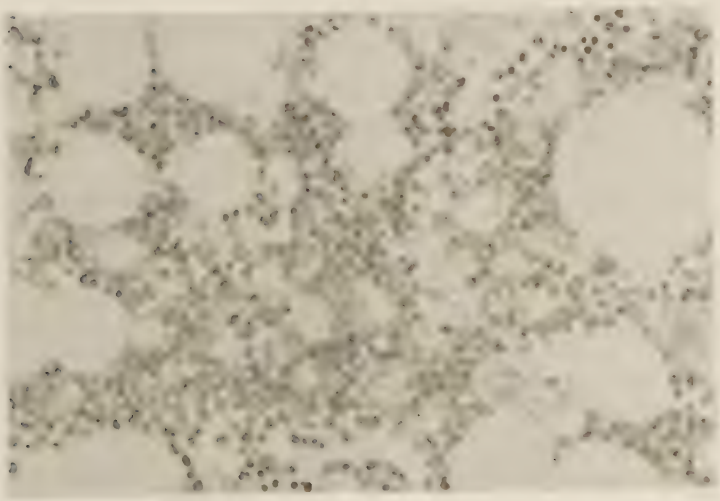


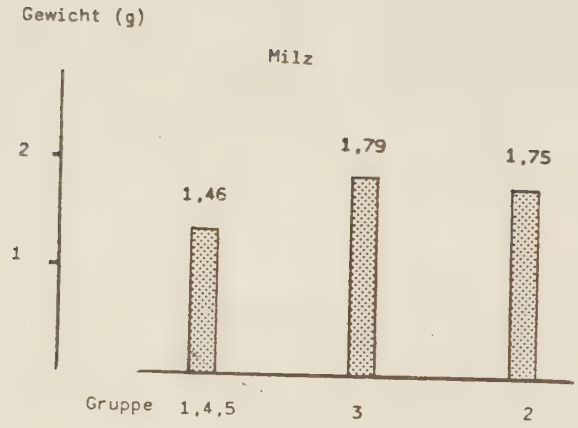
Abb. 19: Knochenmark eines Tieres der Gruppe 3. Die Speichervakuolen sind auf Grund ihrer Substrukturierung klar von Fettzellen abgrenzbar. (Methylmethacrylat; Giemsa, Objektiv 25x)

Tab. 2: Milzgewichte (g) vor und nach Fluosolapplikation

Gruppe 1, 4, 5 Ohne Fluosol	Gruppe 3 10 Tage nach Fluosol-Gabe	Gruppe 2 30 Tage nach Fluosol-Gabe
11 Tiere	4 Tiere	6 Tiere
1,27 g	1,75 g	2,10 g
0,91 g	1,47 g	1,50 g
1,10 g	1,03 g	1,34 g
2,10 g	2,90 g	2,15 g
1,12 g		2,50 g
1,53 g		0,90 g
1,24 g		
2,10 g		
1,95 g		
1,80 g		
0,92 g		
1,46 g MW	1,79 g MW	1,75 g MW
Vergleich:	+ 0,33 g MW + 22 %	+0,29 g MW + 19 %

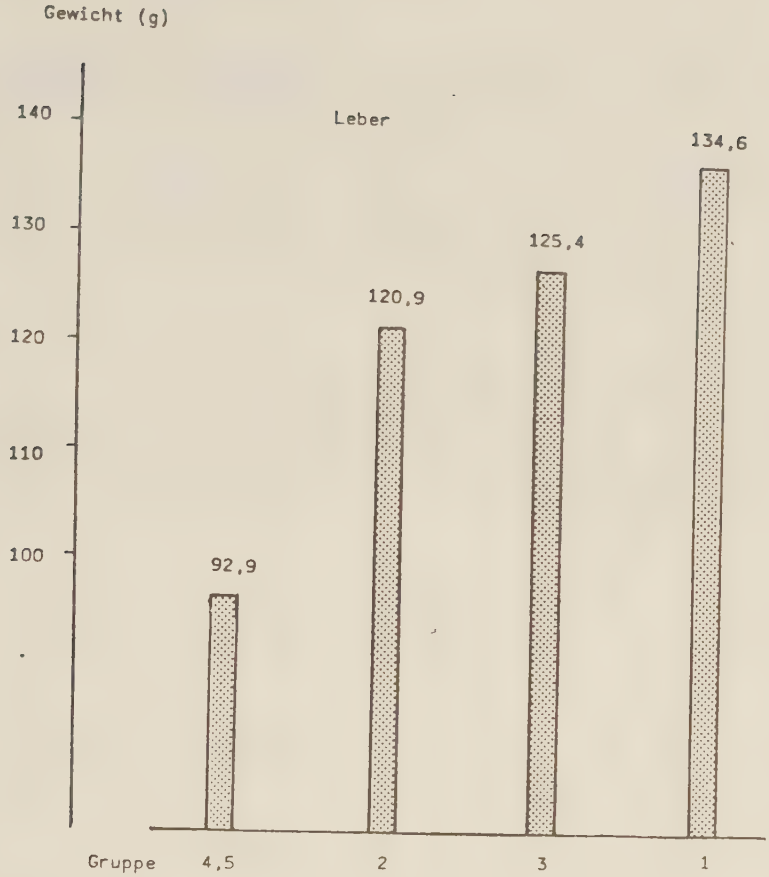
Tab. 3: Lebergewichte (g) vor und nach Fluosolapplikation

Gruppe 4, 5 Kontrolltiere	Gruppe 2 30 Tage nach Fluosol-Gabe	Gruppe 3 Fluosol-Gabe Splenektomie	Gruppe 1 Splenektomie Fluosol-Gabe
7 Tiere	6 Tiere	4 Tiere	4 Tiere
93,7	147,0	101,4	132,2
101,6	134,4	95,4	118,3
97,8	134,3	157,1	131,2
83,0	99,9	147,6	156,5
96,4	107,1		
119,7	102,8		
58,5			
92,9 MW	120,9 MW	125,4 MW	134,6 MW
Vergleich:	+ 27,95 g MW + 30 %	+ 32,43 g MW + 34 %	+ 41,60 g MW + 44 %



Gruppe 1,4,5: Keine Fluosol-Gabe
Gruppe 3: 10 Tage nach Fluosol-Gabe (Steigerung um 22 %)
Gruppe 2: 30 Tage nach Fluosol-Gabe (Steigerung um 19 %)

Abb. 20: Milzgewichte (Addierung der Organgewichte aller Tiere).



Gruppe 4,5: Kontrolltiere
Gruppe 2: 30 Tage nach Fluosol-Gabe (Steigerung um 30 %)
Gruppe 3: Fluosol-Gabe und anschließend Splenektomie (Steigerung um 34 %)
Gruppe 1: Splenektomie und anschließend Fluosol-Gabe (Steigerung um 44 %)

Abb. 21: Lebergewichte (Addierung der Organgewichte aller Tiere).

3.3 Laborwerte

3.3.1 Enzyme

Bei allen Tieren wurden bei Versuchsbeginn, am Ende des Versuchs und je nach Gruppenzugehörigkeit auch nach Splenektomie und nach Fluosolinjektion die Leberenzyme bestimmt (Tab. 4 u. 5). Die leberspezifischen Enzyme OT, PT, gamma GT und alkalische Phosphatase zeigen keine auffälligen Aktivitätsveränderungen.

In der Tiergruppe 1, der 10 Tage nach Milzentfernung Fluosol injiziert wurde, reagieren 50 % der Tiere mit einer deutlichen Erhöhung der LDH, bei 50 % fällt die LDH ab.

Auch in der Gruppe 2, die ausschließlich Fluosol erhalten hat, zeigen sich zu 50 % Aktivitätserhöhung und -minderung der LDH.

Von den Tieren, die nach Fluosolgabe splenektomiert wurden (Gruppe 3), weisen 25 % einen LDH-Anstieg, 75 % eine erniedrigte LDH-Enzymaktivität auf. Laborchemisch findet sich somit kein Anhalt für eine Leberzellschädigung.

Tab. 4: Leberenzyme (mU/ml) der Gruppen 1 und 2 (VB= Versuchsbeginn, VE= Versuchsende)

Tiernr.	Zeitpunkt	OT	PT	g-GT	AP	LDH	a-HBDH
11	VB	8	16	3	64	85	284
	nach Splenekt.	24	12	1	22	173	121
	nach FDA = VE	18	10	7	39	221	167
12	VB	29	39	3	75	63	156
	nach Splenekt.	10	28	2	50	44	30
	nach FDA = VE	15	34	5	46	188	123
13	VB	16	15	2	120	200	112
	nach Splenekt.	7	13	4	38	68	45
	nach FDA = VE	10	17	7	39	65	33
14	VB	6	12	7	152	74	39
	nach Splenekt.	10	11	4	55	87	62
	nach FDA = VE	6	12	9	148	59	45
21	VB	-	24	9	177	35	28
	nach FDA = VE	11	19	10	206	141	89
22	VB	-	23	5	133	69	40
	nach FDA = VE	32	19	6	65	394	285
23	VB	6	9	5	83	95	59
	nach FDA = VE	25	15	8	84	237	142
24	VB	10	33	3	108	165	90
	nach FDA = VE	13	19	4	41	64	37
25	VB	8	23	5	166	96	66
	nach FDA = VE	8	12	5	59	57	25
26	VB	11	11	2	34	214	160
	nach FDA = VE	12	10	6	33	75	47

Tab. 5: Leberenzyme(mU/ml) der Gruppe 3 und der Kontrollgruppen 4 und 5 (VB= Versuchsbeginn, VE= Versuchsende)

Tiernr.	Zeitpunkt	OT	PT	g-GT	AP	LDH	a-HBDH
31	VB	18	33	2	191	75	42
	nach FDA	15	19	6	81	74	38
	nach Splenekt. (= VE)	7	16	5	57	226	162
32	VB	8	17	4	177	146	60
	nach FDA	11	12	7	53	139	99
	nach Splenekt. (= VE)	-	11	7	61	47	38
33	VB	30	40	2	38	57	32
	nach FDA	23	27	4	24	150	94
	nach Splenekt. (= VE)	-	26	5	50	34	21
34	VB	10	25	4	126	197	143
	nach FDA	17	20	12	135	278	177
	nach Splenekt. (= VE)	20	30	9	148	88	57
41	VB	8	33	4	97	103	75
	VE	12	26	5	110	171	131
42	VB	7	23	3	86	78	55
	VE	13	30	6	130	135	87
43	VB	11	10	9	151	126	76
	VE	8	10	5	108	98	62
44	VB	9	12	5	85	101	69
	VE	16	14	5	38	83	50
51	VB	10	30	3	29	27	21
	VE	-	24	4	42	52	38
52	VB	22	21	3	47	295	135
	VE	-	26	3	43	73	50
53	VB	15	14	6	50	342	238
	VE	13	19	7	60	136	93

3.3.2 Blutbild

Von allen Tieren wurden am Anfang und am Ende des Versuchs Blutbilder angefertigt. Den Tieren, die FDA erhielten, wurde sofort nach Injektion ca. 0,5 ml Blut zur Fluorokritbestimmung entnommen ebenso bei Versuchsende. Der Fluorokrit nach Fluosolgabe schwankt zwischen 2,5 % und 4 %, im Durchschnitt liegter bei 3,5 %. In allen Fällen ist bei Versuchsende kein Fluosol im peripheren Blut mehr nachweisbar. Signifikante Veränderungen der folgenden Blutwerte sind bei Abschluß der Versuchsreihe nicht zu beobachten (Tab. 6).

Tab. 6: Blutbilder der Versuchs- und Kontrollgruppen bei Versuchsbeginn (VB) und Versuchsende (VE)(Durchschnittliche Werte aller Tiere)

	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen	
	VB	VE	VB	VE
Hb	12,8 g%	13,4 g%	12,8 g%	11,5 g%
Leukozyten	5,300	5,000	5,280	4,800
Thrombozyten	330,000	29,000	142,000	57,000
Hämatokrit	39,5 %	41,7 %	32,0 %	34,4 %
Differentialblutbild:				
Stabkernige	1,5	2,5	1,7	1,5
Segmentkernige	34,5	31,7	40,6	36,0
Eosinophile	1,0	4,0	2,1	2,6
Basophile	3,5	5,3	1,8	2,5
Lymphozyten	57,0	63,0	53,0	59,0
Monozyten	6,0	3,5	2,4	1,2

3.4 Unerwartetes Verenden von Versuchstieren

In der Versuchsreihe, die zunächst mit 21 Tieren geplant war, mußte nach einigen Wochen festgestellt werden, daß nahezu jedes zweite Tier innerhalb von 4-9 Tagen nach intravenöser Fluosolanwendung verstarb (Abb. 22).

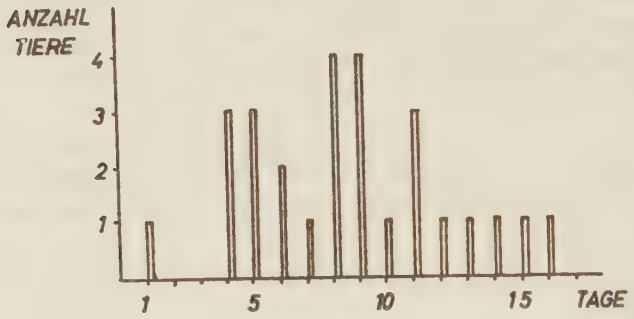


Abb. 22: Zeitraum des Exitus nach FDA- Gabe

Bei der Ursachenforschung konnten nacheinander alle Möglichkeiten, die dieses Phänomen erklären würden ausgeschlossen werden:

1. Schock (Streß, Blutverlust)
2. Operation (Trauma, versehentliche Gefäßunterbindung, Blutung)
3. Herzpunktion (Herzbeuteltamponade, Embolie)
4. Narkosemittel (fehlerhafte Dosierung)
5. Fluosol (zu kalt, zu schnell injiziert, nicht einwandfreie Charge, falsch berechnetes Mischungsverhältnis der einzelnen Fraktionen)
6. nicht ausreichende Nahrungsaufnahme
7. Unterbringung (Zugluft, zu kleine Käfige etc.)

Außer in den Kontrollgruppen, in denen alle Tiere überlebten, war die Ausfallquote in den drei Versuchsgruppen nahezu gleichmäßig verteilt. Die hohe Ausfallquote an Versuchstieren ist Gegenstand der Untersuchungen einer anderen Arbeit (Inauguraldissertation Schmidt).

4. Diskussion

4.1 Vergleich im Ablagerungsmuster von Ratte und Kaninchen

Wie aus den Ergebnissen von Hoffarth (1982) hervorgeht, sieht man bei der Ratte bereits nach einer Stunde substanzspeichernde Makrophagen in den Leberläppchen. Die Substanzmenge nimmt kontinuierlich zu, nach ca. 14 Tagen ist die maximale Speicherung erreicht und nach 12 Monaten findet sich, bei Substanzmengen, die unseren vergleichbar sind, kein bzw. kaum noch ein Nachweis an Fluosol.

Im Verlaufe der Monate ist eine Änderung der Morphologie der Makrophagen eingetreten: Finden sich anfänglich große Speichervakuolen (Substanzäquivalente), so sieht man gegen Ende des Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten deutlich kleinere Speichermakrophagen mit einer feinvakuolären Zytoplasmastruktur und kleinen zentralen Kernen. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß durch die begrenzte Lebensdauer der Makrophagen ein ständiger turn-over des Fluosols von alten zu neuen Makrophagen erfolgen muß.

Die morphologischen Untersuchungen am Kaninchen zeigen prinzipiell gleichartige Veränderungen wie bei Ratten.

Die frühstmögliche Untersuchung der Leber ist 10 Tage nach Fluosolinjektion. Speicherung in den Sinusoiden ist gegeben, oft jedoch in der Beurteilung erschwert durch die alimentäre Verfettung. Dagegen sind die regelmäßig großen Fluosolansammlungen in den Portalfeldern eindeutig. Auf Zusammenhänge der Fluosolentspeicherung wird in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen, da hierfür die Beobachtungszeiträume zu kurz angesetzt und die Tierzahlen zu klein sind.

Sehr wohl läßt sich jedoch feststellen, daß in der Leber der Tiere, bei denen die Milz vor FDA-Gabe entfernt wurde (Gruppe 4) mehr speichernde Makrophagen in den Sinusoiden und Portalfeldern gefunden werden. Dies ist ein nicht unerwarteter Befund, da mit der Milz eine große phagozytäre Kapazität entfernt wurde und eine vermehrte Ablagerung in anderen Organen, nämlich Leber und Knochenmark, erfolgen muß.

Der Grund für die allgemeine Substanzzunahme ist in einer Vermehrung der Fibroblasten und Proliferation der v. Kupfferschen Sternzellen zu suchen.

Zudem ist davon auszugehen, da durch die Entfernung der Milz ein wesentliches Organ des histiozytären Systems nicht mehr vorhanden ist, über längere Zeit mehr Fluosol in der Blutbahn verbleibt und schneller abgeatmet werden kann. Lichtmikroskopisch sind keine Anzeichen

entzündlicher oder reaktiver Veränderungen durch die Speicherung zu sehen.

Aus Experimenten an Ratten sind die Speicherphänomene in der Milz hinlänglich bekannt. Bereits nach wenigen Stunden findet man zahlreiche speichernde Makrophagen mit schaumiger Zytoplasmastruktur, die die Milzpulpa diffus durchsetzen, und nach einer Woche ihr Maximum erreichen (Yokoyama et al. 1975 und 1978)ihre Struktur wird nun wabenartig und sie lagern sich in der roten Pulpa zu Zellaggregaten zusammen.

Bei den Kaninchen finden sich 10 Tage nach Fluosolapplikation unterschiedlich große, z.T. konfluierende, wabige Speichervakuolen sowohl in der roten Pulpa als auch in den Follikeln, während sich nach einem Monat die Speichermakrophagen vorwiegend in der Pulpa und nur noch geringfügig in den Follikeln nachweisen lassen.

Diese Beobachtungen stimmen damit mit den Ergebnissen zahlreicher Autoren überein, wonach bei Kaninchen die maximale Speicherkapazität der Milz nach ca. einer Woche festzustellen ist und es in den folgenden Wochen zu einer allmählichen Entspeicherung kommt. (Yokoyama et al.1975 und 1978, Naito 1978, Lutz et al. 1980).

Nach unseren Ergebnissen dürfte der Entspeicherungsvorgang in den Follikeln beginnen, nachfolgend kommt es auch zur Entspeicherung aus der roten Pulpa. Gruppenspezifische Abweichungen im Speicherungsmuster nach unterschiedlich langer Fluosolexposition werden nicht gesehen.

4.2 Laborwerte

Wie unter 3.3.1. beschrieben, kommt es unter Fluosolbehandlung zu keinen signifikanten Veränderungen der Leberenzyme. Da die Fluorocarbonsubstanz (FDC, FTPA) chemisch inert, demzufolge von der Leberzelle nicht metabolisiert wird, ist davon auszugehen, daß es zu keiner toxischen Schädigung der Leberzelle kommt.

An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, daß in der industriellen Fertigung von Fluosol ein nicht zu vernachlässigender Anteil an Verunreinigung zustande kommt (Le Blanc et al. 1981), wobei man evtl. an eine toxische Wirkung durch die Verunreinigung denken muß.

Bei unseren Untersuchungen fallen leichte LDH-Anstiege auf. Da weder eine verstärkte Eisenspeicherung noch eine Aktivierung der Hämatopoese augenfällig ist, kann eine verstärkte Erythrozytenzerstörung morphologisch nicht nachgewiesen werden. Insofern ist auch die Frage, ob eine

prophylaktische Splenektomie vor FDA-Behandlung zur Vermeidung einer potentiellen Hämolyse sinnvoll sein könnte, durch unsere Ergebnisse nicht zu klären.

Unterschiede zwischen den Blutbildern der Kontroll- und Versuchstiere können nicht festgestellt werden. Bei allen Tieren fälltbei Versuchsende eine Verminderung der Thrombozytenzahl auf, der aber keine pathologische Bedeutung zukommt, weil hohe Schwankungsbreiten bekannt sind.

Als Maß für das Vorhandensein von Fluosol im peripheren Blut wird post injectionem der Fluorokrit bestimmt, der duchschnittlich 3,5% beträgt und bei Versuchsende nicht mehr nachweisbar ist, da inzwischen das gesamte FDA von Blutmakrophagen aufgenommen und im RHS abgelagert bzw. ausgeschieden war.

4.3 Bedeutung der Milzexstirpation für die Substanzelimination

Mit einer nach Fluosolgabe durchgeführten Milzentnahme sofort einen Großteil der gespeicherten Substanz aus den Organismus zu entfernen, war eine Überlegung in der vorliegenden Arbeit.

Für die Annahme , daß bei nicht vorhandener Milz vermehrt Lungenschäden auftreten durch beschleunigtes Abatmen größerer Substanzmengen, hat sich kein morphologisches Korrelat finden lassen.

Die beobachteten Lungenveränderungen bei FDA-behandelten Tieren sind unabhängig davon, ob die Tiere milzexstirpiert waren oder nicht.

Die Pulmonalarterien sind bei Kaninchen bemerkenswert muskelkräftig. In diesen Gefäßen sieht man nach Fluosolgabe eine unerklärliche Vakuolisierung. Möglicherweise liegen degenerative Veränderungen am Muskel oder eine Ablagerung des Fluosols dort vor. Offenbar kommt es zu Gefäßschäden, die den Bluttransport vom rechten Herzen in die Lungen behindern.

Da mit der Exstirpation der Milz ein erhebliches Speicherreservoir entfernt wird, sieht man neben der vermehrten Ablagerung in der Leber auch eine deutliche Zunahme der Fluosolspeicherung im Knochenmark.

Ein längerer intravasaler Verbleib des Fluosols bei fehlender Milz und damit verbundene mögliche Auswirkungen auf das Blutsystem, z.B. Veränderung in der Zusammensetzung der einzelnen Blutfraktionen konnte mit unseren Methoden nicht festgstellt werden.

Es bietet sich kein Anhalt dafür, daß es bei den splenektomierten Tieren zu einer Verminderung ihrer Resistenzlage kommt.

5. Zusammenfassung

Seit mehr als zwanzig Jahren wird an der Herstellung eines synthetischen Erythrozytenersatzes gearbeitet. Neben der heute weitverbreiteten Infusionstherapie zur Volumensubstitution und Verbesserung der Mikrozirkulation ist damit auch der Gastransport, insbesondere die Verbesserung, bzw. Aufrechterhaltung des Sauerstofftransports im Körper ohne Bluttransfusion möglich. Die Anwendungsmöglichkeiten für sauerstofftransportierende Blutersatzmittel sind vielfältig. Grundsätzlich ist für diese Aufgabe die Substanzgruppe der Fluorocarbone geeignet.
In standardisierter Zubereitung sind das Perfluorodecalin und das Perfluortripropylamin (Fluosol^{R}-DA 20 %) verfügbar und umfassend untersucht. Der limitierende Faktor für die Anwendung der Substanzen liegt in ihrer Ablagerung im Retikulohistiozytären System. In der vorliegenden Arbeit wird an tierexperimentellen Untersuchungen (Kaninchen) geprüft,

1. welche Veränderungen auftreten, wenn das Hauptdepot der Substanzen, die Milz entfernt und 10 Tage danach Fluosol-DA 20% parenteral verabreicht wird,
2. welche Auswirkungen auftreten, wenn 10 Tage nach parenteraler Applikation eine Splenektomie durchgeführt wird.

Die pathohistologischen Veränderungen an der Leber, der Milz und dem Knochenmark werden dargestellt, wobei überwiegend die Methylmethacrylattechnik ausgeführt wurde. Grundsätzlich ist festzustellen, daß in der Leber bei Tieren nach Entfernung der Milz vor Fluorocarbongabe mehr speichernde Makrophagen gefunden werden als sonst üblich. Anhaltspunkte dafür, daß nach Milzentfernung und Fluorocarbongabe durch das beschleunigte Abatmen größerer Substanzmengen vermehrt Lungenschäden auftreten, werden nicht gefunden. Nach Milzexstirpation und folgender Fluorocarbongabe findet sich eine deutliche Zunahme der Speicherung besonders auch im Knochenmark.
Weiterhin werden Organgewichtsdifferenzen bei Leber und Milz angegeben. Umfassende Untersuchungen der leberspezifischen Enzyme zeigen keine pathologischen Veränderungen nach Fluorocarbonanwendung.
Auch in den Differentialblutbildern bei Versuchsbeginn und Versuchsende zeigen sich keine charakteristischen Veränderungen nach Anwendung der Fluorocarbone.
Augenfällige Zeichen für eine Verminderung der Resistenzlage finden sich bei den splenektomierten Tieren nicht.

6. Literatur

BEISBARTH, H.: Bericht über die Konferenz "Artificial blood" 1974
Infusionstherapie, 1: 495 (1974)

CLARK, L.C., GOLLAN, F.: Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure.
Science, 152: 1755-1756 (1966)

CLARK, L.C., JR., KAPLAN, S., BECATTINI, F.: The physiologie of synthetic blood.
J. Thoracic Cardiovascular Surg., 60: 757-773 (1970)

CLARK, L.C., JR.: Whole animal perfusion with fluorocarbon dispersions.
Fed. Proc., 29: 1695-1820 (1970)

CLARK, L.C., BECATTINI, F., KAPLAN, S.: Sind Fluorocarbonverbindungen als künstliches Blut verwendbar?
Triangel, 11: 116 (1973)

CZEKELIUS, P.: Does it seem promising to treat fetal hypoxia with oxygenated fluorocarbon? Experiences from animal experiments in rabbits.
In Frey , R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W.Zuckschwerdt, S. 261-265 (1981)

CZEKELIUS, P.: Investigation into the question of fluorocarbon passage from the amniotic cavity to the fetal and maternal organism - Initial results.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 266-269 (1981)

DAVIS, R.H., McDONALD, J.F., KYRIAZIS, G.A., SCHNEIDER, H.P.:
The peritoneal fluid cellular content of adult female new zealand white rabbits.
Lab. anim. Sci., 24: 101-102 (1974)

ENDRICH, B., NEWMAN, M.M., GREENBURG, A.G., INTAGLIETTA, M.:
Fluorocarbon emulsions as a synthetic blood substitute: Effects on microvascular hemodynamics in the rabbit omentum.
J. Surg. Res., 29: 516-526 (1980)

FUJITA, T., SUYAMA, T., YOKOYAMA, K.: Fluorocarbon emulsion as a candidate for artificial blood.
Surg. Res., 3: 436-453 (1973)

GEYER, R.P., MONROE, R.G., TAYLOR, K.: Survival of rats perfused with a fluorocarbon-detergent preparation.
In: Norman, J.C., (ed.): Organ perfusion and preservation
New York: Century Crafts, S. 85-96 (1968)

GEYER, R.P.: Whole animal perfusion with fluorocarbon dispersion.
Fed. Proc., 29 : 1758-1763 (1970)

GEYER, R.P.: Fluorocarbon-polyol artificial blood substitutes.
New Engl. J. Med., 289: 1077-1082 (1973)

GEYER, R.P.: Studies on acute blood replacement with fluorocarbon/ Polyol preparations.
Med. Ernährung, 11: 256 (1973)

GEYER, R.P.: Potential uses of artificial blood substitutes.
Fed. Proc., 34: 1525-1528 (1974)

GEYER, R.P.: Recent development in research with perfluorochemical artificial blood substitutes.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 19-29 (1981)

GOLLAN, F., CLARK, L.C.: Organperfusion with fluorocarbon fluid.
Physiolgist, 9: 191 (1966)

HOFFARTH, C.: Lichtmikroskopische Untersuchungen bei parenteraler Anwendung von Fluorocarbonen (Fluosol-43, Fluosol-DA 20%, Fluosol-DA 35%) nach einmaliger und mehrmaliger Injektion im Tierexperiment.
Inaugural-Dissertation FU Berlin, (1982)

HAUK, H., SCHNEIDER, M., HOFFMANN, H., VOSS, J., FÖRSTER, H., HÜBNER, K.: Experimentelle Untersuchungen an der Ratte zur Leber- und Milzvergrößerung nach Gabe synthetischer Sauerstoffträger.
Verh. Dtsch. Ges. Path., 61: 357 (1977)

HAYASHI, G., SUZUKI, S., MASUKHAWA, K., FUYIKAWA, Y.: Effects of fluorocarbon on the reticuloendothelial system and it's accumulation and excretion in rats.
Proc. II. Intercomp. Conf. on Fluorocarbon (Osaka), 150 (1973)

KITAZAWA, M., OHNISHI, Y.: Long term experiment of perfluorochemicals using rabbits.
Virchows Arch. A (Pathol. Anat.), 398: 1-10 (1982)

LAPIN, R., FRIEDMAN, A., LEVINE, E.M., HUTCHINS, H.L., MALHOTRA, V., DANIEL, L., BARASCH, S.: The pre-operative use of Fluosol-DA 20% in major abdominal surgery.
J. Abdom. Surg., 11: 15-16 (1980)

LE BLANC, M., RIESS, J.: Artificial blood substitutes based on perfluorochemicals.
In: Banks, R.E. (Hrsg.): "Preparation, properties and industrial applications of organofluorine compounds."
New York: John Wiley and Sons, 83-138 (1982)

LE BLANC, M., RIESS, J.: A strategy for the synthesis of pure, inert perfluoroalkylated derivatives designed for blood substitution.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 43-49 (1981)

LUTZ, J., METZENAUER, P.: Effects of potential blood substitutes (Perfluorochemicals) in rat liver and spleen.
Pflügers Arch., 387: 175-181 (1980)

MASUDA, M., HORI, M., OHYANAGI, H., KUSONOKI, T., MITSUNO, T.: Pathological findings of rats after infusion of fluorocarbon emulsion.
Proc. II. Intercomp. Conf. on Fluorocarbon, (Osaka), 217 (1973)

MITSUMO, T., OHYANAGI, H., NAITO, R.: Clinical studies of a perfluorochemical whole blood substitute.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood subtitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 30-40 (1981)

MOTTA, G., RATTO, G.B., SPINELLI, E., AGATI, R., SACCO, A., POLONIATO: Ricerca sperimentale sull'impiego di un fluorocarbonato (FC 43) come sostituto ematico.
Minerva Med., 72: 167-172 (1982)

NAITO, R., YOKOYAMA, K.: Perfluorochemical blood substitutes "Fluosol-43, DA 20% and 35%"
Technical Inform. Ser. No. 5. Osaka/Japan. The Green Cross Corporation (1978)

OHYANAGI, H., KUSONOKI, T., SEKITA, M., YAMASHIA, S., NOGI, Y., MATSUDA, T., MITSUNO, T.: Histological changes of liver and spleen in rats after injection of fluorocarbon emulsion. Proc. II. Intercomp. Conf. on Fluorocarbon (Osaka), 212 (1973)

OHYANAGI, H., KUSONOKI, T., SEKITA, M., HIRONAKA, T., SUGIHARA, S., YAMASHITA, S., TAKENO, M., TEI, M., MITSUNO, T.: Fluorocarbon emulsion as the transporter of the oxygen. III Excretion of i.v. infused FC emulsion related to its accumulation in the body. Resp. and Cir., 22: 468 (1974)

OHYANAGI, H., TABUCHI, Y., SEKITA, M., MATSUDA, T., NAKAYA, S., KAWA, Y., OKAMOTO, M., MITSUNO, T.: Acute and subacute cytogenetic effect of perfluorodecalin emulsion on rat bone marrow cells in vivo. Proc. IVth Int. Cong. Nutr.(Symposium on PFC artificial blood, Kyoto), 275-280 (1975)

OHYANAGI, H., TOSHIMA, K., SEKITA, M., OKAMOTO, M., ITOH, T., MITSUNO, T., NAITO, R., SUYAMA, T., YOKOYAMA, K.: Clinical studies of perfluorochemical whole blood substitutes: safety of Fluosol-DA 20% in normal human volunteers. Clinical Therapeutics, 2: 306-312 (1979)

OKAMOTO, H., YAMANOUCHI, K., IMAGAWA, T., MURASHIMA, R., YOKOYAMA, K., WATANABE, R., NAITO, R.: Persistence of fluorocarbons in circulating blood and organs. Proc. II. Intercomp. Conf. on Fluorocarbon, (Osaka), 268-276 (1973)

OKAMOTO, H., YAMANOUCHI, K., YOKOYAMA, K.: Retention of PFC in circulating blood and organs of animals after intervenous injection of their emulsions. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 23: 1452-1457 (1975)

OKAMOTO, H., IWAI, M., TSUDA, Y., YOKOYAMA, K.: Changes of particle size of perfluorochemical emulsion in circulation. Proc. IVth Int. Cong. Nutr.(Symposium on PFC artificial blood, Kyoto), 73-82 (1975)

OYAMA, T., MATSUKI, A., WAKAYAMA, S., TANIOKA, F., KUDO, T., NOGUCHI, T.:
Effects of FDA 20% infusion of circulatory and endocrine function in surgical patients.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K.(Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 187-192 (1981)

PFANNKUCH, F., SCHNOY, N.: Verbleib des blutgastransportierenden Fluorkohlenwasserstoffes Fluorocarbon-43 im Organismus bei parenteraler Anwendung im Tierversuch.
Anästhesist, 28: 511-516 (1979)

ROSENBLUM, W.J., HADFIELD, M.G., MARTINEZ, A.J., SCHATZKI, P.: Alteration of liver and spleen following intravenous infusion of fluorocarbon emulsion.
Arch. Pathol. Lab. Med., 100: 213-217 (1976)

SADA, T., TOYAMA, Y., AIZAWA, Y., MURAKAMI, S.: Plasma fluoride concentration and urinary fluoride excretion following Fluosol-DA administration in man.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K.(Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 225-229 (1981)

SCHNEIDER, M., HAUK, H., FÖRSTER, H., HÜBNER, K.: Morphologische Untersuchungen der Organveränderungen nach Infusion verschiedenartiger perfluorierter Kohlenwasserstoffe bei Ratten.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol., 62: 312-315 (1978)

SCHNOY, N., PFANNKUCH, F., BEISBARTH, H.: Fluorocarbone als Erythrozytenersatz .
Anästhesist, 28: 503 (1979)

SLOVITER, H.A., KAMIMOTO, T.: Erythrocyte substitute for perfusion of brain.
Nature, 216: 458 (1967)

SLOVITER, H.A.: Perfluorocompounds as artificial erythrocytes.
Fed. Proc., 34: 1484 (1975)

TAUBER, A., WENDT, P., MITTELMEIER, T., STAMATOPOULOS, C., BEISBARTH, H., MAURER, P., BLÖMEL, G.: Initial perfusion of extremities with Fluosol-43 prior to replantation - metabolic and hemodynamic investigations in rabbits.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 245-254 (1981)

TREMPER, K.K., LAPIN, R., LEVINE, E., FRIEDMAN, A., SHOEMAKER, W.C.: Hemodynamic and oxygen transport effects of a perflourochemical blood substitute, Fluosol-DA.
Critical Care Med., 8: 738-741 (1980)

VERCELLOTTI, G.M., HAMMERSCHMIDT, D.E., CRADDOCK, P.R., JAKOB, H.S.: Activation of plasma complement by perfluorocarbon artificial blood: Probable mechanism of adverse pulmonary reaction in treated patients and rationale for corticosteroid prophylaxis.
Blood, 59: 1299-1304 (1982)

WATANABE, Y., TSUCHIDA, S., MAKI, M., HARADA, T.: Effectiveness of Fluosol-DA on a urological patient.
In Frey, R., Beisbarth, H., Stosseck, K. (Hrsg.): Oxygen carrying colloidal blood substitutes.
München: W. Zuckschwerdt, S. 236-242 (1981)

YAMANOUCHI, K., MURASHIMA, R., YOKOYAMA, K.: Determination of perfluorocarbons in organs and body fluids by gas chromatography.
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 23: 1363-1367 (1975)

YOKOYAMA, K., SUZUKI, A., UTSUMI, I., NAITO, R.: Determination of particle size distribution of flourocarbon emulsion by means of centrifugal sedimentation.
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 22: 2966-2971 (1974)

YOKOYAMA, K., YAMANOUCHI, K., MURASHIMA, R.: Excretion of perfluorochemicals after intravenous injection of their emulsion.
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 23: 1368-1373 (1975)

YOKOYAMA, K., YAMANOUCHI, K., WATANABE, M., MATSUMOTO, T., MURASHIMA, R., DAIMOTO, T., HAMANO, T., OKAMOTO, H., SUYAMA, T., WATANABE, R., NAITO, R.:
Preparation of perfluorodecalin emulsion, an approach to the red cells substitute.
Fed. Proc., 34: 1478-1483 (1975)

YOKOYAMA, K., YAMANOUCHI, K., OHYANAGY, H., MITSUNO, T.: Fate of perfluorochemicals in animals after intravenous injection or hemodilution with their emulsions.
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 26: 956-966 (1978).

Herrn Prof. Dr. med. S. Blümcke möchte ich für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche Beratung meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. F. Pfannkuch für die umfassende Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. med. vet. Ch. Grosse-Siestrup danke ich herzlich für seine Hilfe und wertvollen Ratschläge bei den Tierexperimenten.

Herrn Prof. Dr. med. R. Averdunk sei gedankt für die freundliche Unterstützung bei der Interpretation der Laborwerte.Frau Popp und Frau Ossa danke ich für ihre Hilfe bei der Herstellung der histologischen Präparate. Frau Tiburtius danke ich für die Herstellung der Fotoabzüge. Frau Weißleder möchte ich danken für ihre Mithilfe bei den Tierversuchen.

Lebenslauf

Am 29. März 1953 wurde ich, Marianne Panisch, geb. Schwab, in Bad Friedrichshall geboren.

Von April 1960 bis März 1964 besuchte ich die Grundschule in Bad Friedrichshall, wechselte dann in die Realschule, die ich im Juni 1969 mit Abschluß der mittleren Reife verließ.

Von April 1971 bis März 1973 besuchte ich die staatlich anerkannte Lehranstalt für Krankengymnastik Prof. Dr. med. Paul Vogler in Berlin-Moabit.

Bis Juni 1975 arbeitete ich als Krankengymnastin im Städtischen Krankenhaus "Am Urban" in Berlin-Kreuzberg.

Von Februar 1975 bis Dezember 1977 besuchte ich das Berlin-Kolleg in Berlin Schöneberg und erwarb im Dezember 1977 die allgemeine Hochschulreife.

Im Sommersemester 1978 nahm ich an der Freien Universität Berlin das Medizinstudium auf. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommer 1980.

Im Frühjahr 1982 begann ich die vorliegende Arbeit am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charlottenburg.

Die ärztliche Prüfung legte ich am 16. 11. 1984 ab.